



## Metode pengujian dengan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) – Bagian 1: Residu kloramfenikol dalam daging, telur, susu, dan olahannya





© BSN 2009

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang menyalin atau menggandakan sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun dan dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN  
Gd. Manggala Wanabakti  
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.  
Telp. +6221-5747043  
Fax. +6221-5747045  
Email: [dokinfo@bsn.go.id](mailto:dokinfo@bsn.go.id)  
[www.bsn.go.id](http://www.bsn.go.id)

Diterbitkan di Jakarta



## Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata .....	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Istilah dan definisi .....	1
3 Prinsip.....	1
4 Bahan .....	2
5 Peralatan .....	2
6 Cara uji.....	2
7 Interpretasi hasil .....	4
Lampiran A (informatif) Ketentuan tambahan.....	5
Bibilografi .....	6



## Prakata

Standar Metode pengujian dengan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) – Bagian 1: Residu kloramfenikol dalam daging, telur, susu, dan olahannya disusun dan dirumuskan oleh Subpanitia Teknis (SPT) 67-03-S3 Metode Pengujian Peternakan. Standar ini disusun dengan maksud untuk standardisasi metode pengujian residu kloramfenikol dalam daging, telur, susu, dan olahannya secara kualitatif dan kuantitatif serta mendukung perundangan-undangan negara Republik Indonesia yang berlaku di bidang keamanan pangan asal hewan.

Standar ini telah dibahas dalam rapat teknis dan terakhir disepakati dalam rapat konsensus Subpanitia Teknis (SPT) 67-03-S3 Metode Pengujian Peternakan pada tanggal 14 Oktober 2008 di Jakarta yang dihadiri oleh anggota Subpanitia Teknis dan pihak terkait lainnya.

Standar ini juga telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 10 Februari 2009 sampai dengan 10 April 2009 dengan hasil akhir RASNI.





## **Metode pengujian dengan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) – Bagian 1: Residu kloramfenikol dalam daging, telur, susu, dan olahannya**

### **1 Ruang lingkup**

Standar ini menetapkan metode uji residu kloramfenikol dalam daging, telur, susu, dan olahannya secara kualitatif maupun kuantitatif dengan menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT).

### **2 Istilah dan definisi**

#### **2.1**

##### **daging**

bagian otot skeletal dari karkas ternak /hewan yang aman, layak dan lazim, dikonsumsi oleh manusia, dapat berupa daging segar, daging segar dingin, atau daging beku

#### **2.2**

##### **daging olahan**

daging yang telah mengalami pengolahan

#### **2.3**

##### **residu kloramfenikol**

kloramfenikol yang terkandung dalam daging, telur, dan susu, baik sebagai akibat langsung maupun tidak langsung dari penggunaan kloramfenikol

#### **2.4**

##### **susu**

cairan yang berasal dari ambing ternak perah sehat dan bersih, yang diperoleh dengan cara pemerahan yang benar sesuai ketentuan yang berlaku, yang kandungan alaminya tidak dikurangi atau ditambah sesuatu apapun dan belum mendapat perlakuan apapun kecuali proses pendinginan

#### **2.5**

##### **susu olahan**

susu yang telah mengalami proses pengolahan

#### **2.6**

##### **telur**

telur yang dihasilkan oleh unggas yang belum mengalami proses pengolahan dan pengeraman untuk dikonsumsi manusia

#### **2.7**

##### **telur olahan**

telur yang telah mengalami proses pengolahan

### **3 Prinsip**

Residu kloramfenikol dipisahkan dari matrik contoh, dimurnikan kemudian diidentifikasi dan dikuantifikasi pada KCKT dengan kolom fase terbalik, detector UV pada panjang gelombang 270 nm.



## 4 Bahan

### 4.1 Standar pembanding

Kloramfenikol

### 4.2 Bahan kimia dan penunjang

- a) asetonitril p.a,
- b) metanol p.a,
- c) metanol KCKT *grade*,
- d) n-heksana,
- e) natrium klorida (NaCl),
- f) *aquabidest*,
- g) gas nitrogen,
- h) filter *polytetrafluoroethylene* (PTFE) (0,45  $\mu$ m, 47 mm),
- i) filter (0,45  $\mu$ m, 13 mm).

## 5 Peralatan

- a) neraca analitik,
- b) gelas ukur (10 ml, 100 ml, 500 ml),
- c) labu *Erlenmeyer* (250 ml, 500 ml),
- d) labu ukur (10 ml, 100 ml),
- e) pipet volumetrik (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml),
- f) mikro pipet (50  $\mu$ l sampai dengan 200  $\mu$ l, 100  $\mu$ l sampai dengan 1000  $\mu$ l),
- g) pH meter,
- h) *refrigerator*,
- i) corong,
- j) *homogenizer ultraturax* atau *food processor*,
- k) *vortex mixer*,
- l) sentrifus,
- m) unit penyaring vakum,
- n) alat penguap (*vacuum rotary evaporator* atau *nitrogen evaporator*),
- o) *ultrasonic bath*,
- p) satu unit KCKT dilengkapi dengan detektor UV,
- q) kolom KCKT fase terbalik C-18,
- r) labu *evaporator* (50 ml) atau tabung reaksi (10 ml),
- s) tabung reaksi/tabung sentrifus bertutup 50 ml.

## 6 Cara uji

Pengujian selalu disertai dengan kontrol positif (5 g atau 5 ml contoh yang ditambah larutan standar pembanding dengan konsentrasi 10  $\mu$ g/ml sebanyak 75  $\mu$ l, sehingga dihasilkan konsentrasi akhir 0,15  $\mu$ g/g atau 0,15  $\mu$ g/ml).

### 6.1 Pembuatan larutan fase gerak

Campur metanol KCKT *grade* dan *aquabidest* dengan perbandingan 1 : 1, kemudian saring menggunakan filter PTFE, lakukan sonifikasi dengan menggunakan *ultrasonic bath* untuk menghilangkan gas dan udara (*degassing*).



## 6.2 Pembuatan larutan standar

### 6.2.1 Larutan stok standar kloramfenikol dengan konsentrasi 1000 µg/ml

Timbang 10 mg standar pembanding kloramfenikol, kemudian dilarutkan dalam larutan metanol KCKT *grade* dan tepatkan sampai 10 ml.

### 6.2.2 Larutan standar kerja

Pipet sebanyak 100 µl larutan 6.2.1, kemudian tambahkan larutan 6.1, dan tepatkan sampai volume 10 ml, sehingga diperoleh konsentrasi 10 µg/ml.

### 6.2.3 Larutan untuk kurva standar

- Pipet sebanyak 1 ml larutan 6.2.2, tambahkan larutan 6.1 dan tepatkan sampai volume 10 ml, sehingga diperoleh konsentrasi 1 µg/ml.
- Pipet sebanyak 500 µl dari larutan 6.2.3.a, tambahkan larutan 6.1 dan tepatkan sampai volume 10 ml, sehingga diperoleh konsentrasi 0,05 µg/ml.
- Pipet sebanyak 1 ml dari larutan 6.2.3.a, tambahkan larutan 6.1 dan tepatkan sampai volume 10 ml, sehingga diperoleh konsentrasi 0,1 µg/ml.
- Pipet sebanyak 2 ml dari larutan 6.2.3.a, tambahkan larutan 6.1 dan tepatkan sampai volume 10 ml, sehingga diperoleh konsentrasi 0,2 µg/ml.
- Pipet sebanyak 400 µl dari larutan 6.2.2, tambahkan larutan 6.1 dan tepatkan sampai volume 10 ml, sehingga diperoleh konsentrasi 0,4 µg/ml.
- Pipet sebanyak 800 µl dari larutan 6.2.2, tambahkan larutan 6.1 dan tepatkan sampai volume 10 ml, sehingga diperoleh konsentrasi 0,8 µg/ml.

## 6.3 Prosedur ekstraksi contoh

- Timbang 5 g contoh padat/semi padat yang telah dihomogenkan dengan *homogenizer ultraturax* atau *food processor* untuk contoh cair kocok dahulu kemudian pipet 5 ml masukkan ke dalam tabung reaksi/tabung sentrifus bertutup 50 ml
- Tambahkan 10 ml asetonitril p.a. dan kocok dengan *vortex mixer* atau homogenizer selama 30 detik.
- Sentrifus dengan kecepatan 3.000 rpm selama 10 menit. Pisahkan supernatan dari endapan.
- Tambahkan 10 ml asetonitril p.a. kedalam endapan 6.3.c, dan kocok dengan *vortex mixer* atau homogenizer selama 30 detik.
- Sentrifus dengan kecepatan 3.000 rpm selama 10 menit. Pisahkan supernatan dari endapan dan gabungkan supernatan ini dengan supernatan 6.3.c.
- Tambahkan 1,5 g natrium klorida kedalam larutan 6.3.e, dan kocok dengan *vortex mixer* selama 1 menit.
- Sentrifus dengan kecepatan 3.000 rpm selama 5 menit. Pisahkan supernatan dari endapan.
- Tambahkan 5 ml n-heksana kedalam supernatan 6.3.g, dan kocok dengan *vortex mixer* selama 30 detik. Diamkan sampai terpisah sempurna hingga terbentuk 2 lapisan, yaitu lapisan n-heksana dibagian atas dan lapisan asetonitril dibagian bawah.
- Buang lapisan n-heksana dengan menggunakan pipet secara hati-hati.
- Ulangi 6.3.h dan 6.3.i.
- Keringkan lapisan asetonitril dengan alat penguap (*vacuum rotary evaporator*) atau nitrogen evaporator hingga hampir kering.
- Larutkan kembali ekstrak 6.3.k hingga menjadi 200 µl dengan larutan 6.1 kemudian saring dengan filter (0,45 µm, 13 mm). Larutan siap diinjeksikan ke KCKT.



## 6.4 Penetapan dengan KCKT

### 6.4.1 Kondisi KCKT

- a) kolom : fase terbalik C-18,
- b) detektor : UV, panjang gelombang 270 nm
- c) fase gerak : larutan 6.1.
- d) kecepatan alir : 1 ml/menit

### 6.4.2 KCKT

- a) Injeksikan larutan 6.2.3 secara berurutan ke KCKT dengan kondisi 6.4.1 hingga diperoleh kurva linier ( $y = a + bx$ ).
- b) Injeksikan contoh 6.3.I.
- c) Lakukan pengamatan terhadap kurva pada kromatogram. Adanya kurva dengan waktu tambat yang sama dengan waktu tambat standar menunjukkan adanya residu kloramfenikol pada contoh
- d) Apabila area yang dihasilkan dari contoh 6.4.2.b melebihi area kurva kalibrasi 6.4.2.a, maka ekstrak 6.3.I dapat diencerkan sampai diperoleh area dalam rentang kurva kalibrasi.

## 7 Interpretasi hasil

Kadar residu kloramfenikol dihitung menggunakan persamaan garis:

$$y = a + bx$$

**Keterangan :**

y = area contoh

a = *intercept*

b = *slope*

$$\text{Kadar residu } \mu\text{g/g atau } \mu\text{g/ml} = \frac{X \times V_s}{B}$$

**Keterangan :**

X : Konsentrasi residu dalam contoh hasil integrasi kurva ( $\mu\text{g/g}$  atau  $\mu\text{g/ml}$ )

Vs : Volume akhir sebelum injeksi (ml)

B : Berat contoh (g) atau volume contoh (ml)



**Lampiran A**  
(informatif)  
**Ketentuan tambahan**

1. Setiap laboratorium yang akan menggunakan metode ini harus melakukan uji akurasi (ketepatan), presisi (ketelitian), limit deteksi (batas deteksi), dan limit kuantifikasi (batas penetapan).
2. Setiap akan melakukan pengujian gunakan selalu larutan standar kerja yang baru dibuat, sedangkan larutan stok standar dapat disimpan sampai dengan 1 bulan pada temperatur  $-18^{\circ}\text{C}$ .





## Bibilografi

Horwitz, W and G. W. Latimer (2005) Drugs and Feed Additive in Animal Tissues *in* Official Methods of Analysis of AOAC International, Edisi 18, chapter. 23

Penney, L; A. Smith; B. Coates, and A. Wijewickreme (2005). *Determination of Chloramphenicol Residues in Milk, Eggs, and Tissues by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*. J. AOAC International Vol. 88 No 2: 645 -653.











**BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN**  
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3-4  
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270  
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : [bsn@bsn.or.id](mailto:bsn@bsn.or.id)